

EMPAQUETAMENT FUNCIONAL DEL DNA: EL NUCLEOSOMA I LES ESTRUCTURES D'ORDRE SUPERIOR DE LA CROMATINA

JOAN-RAMON DABAN

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Facultat de Ciències. Universitat Autònoma de Barcelona.

Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular. Facultat de Ciències (Edifici Cs). Universitat Autònoma de Barcelona. 08193-Bellaterra (Barcelona).
Adreça electrònica: JoanRamon.Daban@uab.es

SUMMARY

This chapter summarizes and discusses our present knowledge about the structural solution found by eukaryotic cells to construct their nuclear three-dimensional memory from extremely long DNA molecules. The first section describes the structural properties of the nucleosome, the fundamental unit used by the cell to fold its nuclear DNA. The second section is an overview of the dynamics and functional properties of the nucleosome. In particular, the results obtained in studies on the mechanism of nucleosome formation and on the involvement of this particle in transcription are discussed. The third section describes the folding of nucleosome chains into chromatin fibers which constitute the second level of DNA packaging in the cell nucleus. Various structural models proposed in different laboratories for the arrangement of nucleosomes within chromatin fibers are discussed.

RESUM

Aquest capítol resumeix i discuteix el nostre coneixement actual sobre la solució estructural trobada per la cèl·lula eucariota per construir una memòria nuclear tridimensional a partir de molècules extremadament llargues de DNA. La primera part descriu les propietats estructurals del nucleosoma, la unitat fonamental emprada per la cèl·lula per plegar el seu DNA nuclear. La segona part és un resum de les propietats dinàmiques i funcionals del nucleosoma. En particular, es discuteixen els resultats obtinguts en estudis del mecanisme de formació del nucleosoma i sobre la participació d'aquesta partícula en la transcripció. La

tercera part descriu el plegament de les cadenes de nucleosomes per formar les fibres de cromatina que constitueixen el segon nivell d'empaquetament del DNA en el nucli cel·lular. Es discuteixen diversos models estructurals suggerits en diversos laboratoris per a l'organització dels nucleosomes dins les fibres de cromatina.

LA MEMÒRIA DE LA CÈL·LULA

Els enginyers informàtics imaginem els ordinadors del futur amb memòries tridimensionals i amb capacitat d'emmagatzemar informació en unitats de la grandària d'una molècula. Aquest somni futurista, que permetria augmentar en diversos ordres de magnitud la densitat d'informació de les memòries dels ordinadors disponibles actualment, és una realitat materialitzada per la vida en el nucli de les cèl·lules des de fa més de 1.000 milions d'anys. D'acord amb la teoria de la informació, tenint en compte que les cadenes de DNA contenen quatre tipus de bases nitrogenades diferents (A, T, G, C), cada nucleòtid té un contingut d'informació de 2 bits. Això significa que, per exemple, en els mamífers, el nucli d'una cèl·lula diploide típica (aproximadament 10.000 milions de nucleòtids) conté una memòria de $2 \cdot 10^{10}$ bits (equivalent a 2,5 Gbytes) en un volum d'aproximadament 10^{-10} cm^3 .

Les memòries dels ordinadors actuals són planes, són fetes amb materials que s'estenen en dues dimensions. En les cèl·lules, la memòria ocupa un espai tridimensional però està formada per estructures lineals, les llargues molècules de DNA dels cromosomes. Això genera un problema estructural molt complex, ja que les cèl·lules tenen una enorme longitud de DNA (aproximadament 1,7 m per cèl·lula diploide en el cas dels mamífers) que ha d'ésser empaquetat en un nucli d'aproximadament $6 \mu\text{m}$ de diàmetre. En els propers apartats es descriuran les estructures que permeten plegar el DNA per fer-lo cabre d'una manera ordenada dins el nucli cel·lular.

ESTRUCTURA DEL NUCLEOSOMA

Gran part dels esforços de la biologia molecular actual s'han concentrat en l'estudi de les propietats i de la regulació de gens específics. En aquests treballs s'investiguen seqüències específiques de DNA i proteïnes que interaccionen específicament amb aquestes seqüències. En canvi, per resoldre el problema de l'empaquetament de *tot* el DNA, independentment de quina sigui la seva seqüència, és obvi que no es poden buscar solucions basades en interaccions específiques. La cèl·lula ha trobat una solució general per a aquest problema que consisteix en el fet que, aproximadament cada 200 pb, el DNA s'enrotlla fent dues voltes sobre un nucli proteic format per histones (Hewish i Burgoyne, 1973; Kornberg, 1977; Wolffe, 1995). Aquesta estructura és el nucleosoma, el qual té una part central que s'anomena partícula nucli (*core particle*) que consta de 146 pb de DNA que donen 1 volta i 3/4 sobre un octàmer d'histones ($\text{H2A}_2\text{H2B}_2\text{H3}_2\text{H4}_2$). El nucleosoma es completa amb una molècula d'histona H1 (anomenada també H5 en algunes espècies) que interacciona amb el DNA d'unió (*linker*) que hi ha entre partícules nucli consecutives. La longitud del DNA d'unió varia molt entre espècies. Per exemple, mentre que el DNA d'unió en el llevat i altres fongs té una longitud de ~ 20 pb (Kornberg, 1977), en l'esperma d'*Holothuria tubulosa* (Cornudella i Rocha, 1979) i d'altres equinoderms (Williams *et al.*, 1986) la longitud és ~ 90 pb. Tenint en compte que la longitud d'un segment de DNA de 200 pb estès és ~ 70 nm, i que la partícula nucli té una llargada màxima de

~11 nm, resulta que el nucleosoma redueix aproximadament sis vegades la longitud del DNA.

L'estructura de l'octàmer d'histones ha estat establerta per Moudrianakis i col·laboradors (Arents *et al.*, 1991). A la figura 1 (annex 6) es pot veure que l'octàmer té forma de falca deformada que és molt més ampla a la zona on són els dímers d'H2A,H2B (color blau). Aquests dos dímers d'H2A,H2B són situats als dos costats de la zona central que conté dos dímers d'H3,H4 (color blanc) i, en conjunt, l'estructura forma una rampa en forma d'hèlix levogira sobre la qual es pot enrotllar el DNA. L'esquelet bàsic d'aquesta estructura és una col·lecció de vuit repeticions (una per cada molècula d'histona) d'un element estructural del tipus hèlix α curta-llaç-hèlix α llarga-llaç-hèlix α curta que ha rebut el nom de plegament d'histona (*histone fold*) i que es troba en altres proteïnes que interaccionen amb el DNA (Arents i Moudrianakis, 1995). L'extrem N-terminal de la primera hèlix α curta i les dues zones extremes on hi ha la juntura entre l'hèlix α llarga i les hèlixs curtes (figura 2) són les responsables de la interacció amb el DNA.

Aquestes prediccions sobre les zones d'ancoratge del DNA sobre l'octàmer d'histones, basades en el coneixement de l'estructura de l'octàmer d'histones, han estat confirmades recentment per Richmond i col·laboradors (Luger *et al.*, 1997), directament a partir de l'estructura de cristalls de partícules nucli (figura 3 de l'annex 6). En els catorze llocs on el solc petit de la doble hèlix toca les histones hi ha un residu arginina que interacciona amb un grup fosfat del DNA; els dipòls generats per les hèlixs α del plegament d'histona també interaccionen electrostàticament amb els fosfats. A més, en aquesta zona s'estableixen altres interaccions no específiques: ponts d'hidrogen entre els grups amida de l'esquelet polipeptí-

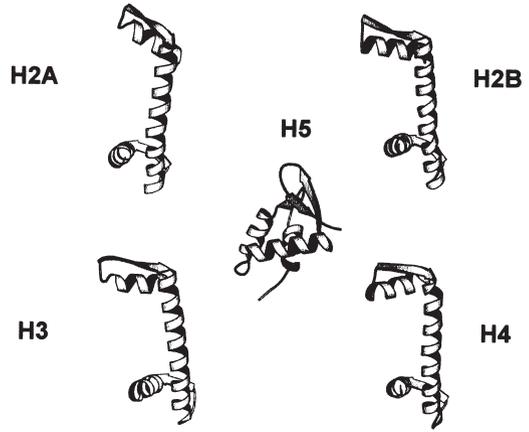


FIGURA 2. Estructura de la part globular de la histona H5 (Ramakrishnan *et al.*, 1995), i del motiu estructural *plegament d'histona* corresponent a les histones de la partícula nucli (H2A, H2B, H3, H4). Reproducció autoritzada d'Arents i Moudrianakis (1995), copyright 1995 National Academy of Sciences, USA.

dic de les histones i els àtoms d'oxigen dels fosfats; ponts d'hidrogen entre grups bàsics o hidroxils de les cadenes laterals de les histones i els fosfats; i contactes no polars entre les histones i les desoxiriboses del DNA. Tots aquests enllaços són de tipus inespecífic i, en conjunt, encara que també s'hagin detectat algunes interaccions entre les cadenes laterals de les histones i les bases del DNA, es pot concloure que l'estructura de l'octàmer d'histones permet la unió amb el DNA amb independència de la seqüència de bases.

Mitjançant la formació de nucleosomes, les cèl·lules eucariotes han aconseguit, doncs, un sistema que, en principi, permet el plegament de qualsevol seqüència de DNA. Cal tenir en compte, però, que hi ha unes certes preferències respecte a l'orientació del corbament del DNA en el nucleosoma. Generalment el DNA es plega de tal manera que les parelles de bases A·T estan més freqüentment a les zones on el solc petit està encarat cap a l'octàmer d'histones,

mentre que les parelles G·C es troben principalment a les regions on el solc petit està encarat cap enfora de la partícula nucli (Satchwell *et al.*, 1986). Això és perquè les parelles de bases A·T admeten una compressió més gran que les G·C en el solc petit. Cal tenir en compte que, en el nucleosoma, el DNA està tan corbat que, mentre que la distància entre bases consecutives de la doble hèlix a la cara interna és $\sim 0,3$ nm, a la perifèria de la partícula aquesta distància és $\sim 0,4$ nm. També sabem que hi ha seqüències que no permeten la formació de nucleosomes. En particular, les seqüències del tipus poliA·poliT formen ponts d'hidrogen addicionals entre parelles de bases de pisos consecutius de la doble hèlix (Nelson *et al.*, 1987), la qual cosa els dóna tanta rigidesa que no poden plegar-se per formar nucleosomes. D'altra banda, mentre que la majoria de les seqüències del DNA genòmic tenen una afinitat semblant per a les histones (Lowary i Widom, 1997), hi ha seqüències que tenen més afinitat relativa per a les histones i provoquen la col·locació de nucleosomes en llocs concrets del genoma que poden tenir importància funcional (Widlund *et al.*, 1997).

En contrast amb les histones de la partícula nucli, la part central globular de la histona H1/H5 adopta un plegament (Ramakrishnan *et al.*, 1993; figura 2) que és una variant del tipus hèlix-volta-hèlix que s'ha trobat en diverses proteïnes que interaccionen específicament amb el solc gran del DNA. Mentre que els estudis inicials (Allan *et al.*, 1980) varen indicar que la part globular de la histona H1/H5 s'uneix de manera simètrica (en el punt on l'eix de simetria travessa el centre del DNA de la partícula nucli) a les cadenes de DNA d'unió que entren i surten de la partícula nucli, hi ha resultats recents obtinguts amb un nucleosoma de seqüència específica que indiquen que la unió és asimètrica (Pruss *et al.*, 1996). Estu-

dis fisicoquímics diversos (Puigdomènech *et al.*, 1980; Böhm i Crane-Robinson, 1984) varen permetre demostrar que tant les histones del tipus H1/H5 com les histones de la partícula nucli tenen segments a les zones terminals que no formen part de les regions plegades considerades fins ara en aquest apartat. Aquestes cues no estructurades contenen molts residus amb càrrega positiva (lisines i arginines) i són substrat de diverses modificacions (principalment acetilacions i fosforilacions) posttraduccional (Wolffe, 1995). A la partícula nucli, les cues carregades estan esteses i arriben a envair part de l'espai situat més enllà del DNA (Luger *et al.*, 1997; figura 3 de l'annex 6), la qual cosa fa pensar que poden tenir una funció relacionada amb la interacció entre nucleosomes en la cromatina empaquetada (vegeu el darrer apartat), més que no pas amb l'estabilització del nucleosoma en si. D'acord amb aquesta possibilitat, hi ha resultats (Ausió *et al.*, 1989) que indiquen que l'eliminació de les cues de les histones de la partícula nucli, mitjançant digestió amb tripsina, no altera substancialment l'estabilitat del nucleosoma.

DINÀMICA FUNCIONAL DEL NUCLEOSOMA

L'energia lliure que s'estima necessària per al corbament del DNA a la partícula nucli és d'unes 75 kcal/mol (Lowary i Widom, 1997). No obstant això, la partícula és termodinàmicament estable perquè les interaccions histona-DNA compensen aquest component energètic desfavorable i donen una variació neta d'energia lliure d'aproximadament -10 kcal/mol per a la formació de partícules nucli a força iònica propera a la fisiològica (Aragay *et al.*, 1991). Les seqüències posicionadores de nucleosomes donen una estabilitat addi-

cional de -1 a -3 kcal/mol (Shrader i Crothers, 1989).

La formació espontània del nucleosoma *in vitro* sense la participació de factors addicionals va ser demostrada per Ruiz-Carrillo *et al.* (1979). La reacció de formació del nucleosoma és ràpida (Daban i Cantor, 1982a; Díaz i Daban, 1986) però té un mecanisme complex, esquematitzat a la figura 4, que ha estat establert a partir dels resultats obtinguts emprant diverses aproximacions experimentals que van des de les digestions enzimàtiques fins a la dispersió de raigs X de sincrotró. Com que sabem que a força iònica fisiològica, en absència de DNA, l'octàmer d'histones de la partícula nucli està dissociat i forma dímers H2AH2B i tetràmers H₃H₄, i que cadascun d'aquest oligòmers per separat s'uneix al DNA (Aragay *et al.*, 1988; Samsó i Daban, 1993) (figura 4, reacció i), cal esperar que durant la reacció de formació del nucleosoma aquestes dues parelles s'uneixin *aleatòriament* amb diferents re-

gions d'una molècula de DNA o amb diferents fragments de DNA. S'ha demostrat que els complexos DNA-(H2A,H2B) i DNA-(H3,H4) es transfereixen histones entre ells (figura 4, reacció iii) i arriben a formar partícules amb les quatre histones (Aragay *et al.*, 1988), les quals sofreixen finalment una reacció intramolecular (figura 4, reacció v), dirigida pel tetràmer format per les histones H3,H4, que dóna lloc a partícules nucli completament plegades (Daban i Cantor, 1982b).

El fet que les histones H3,H4 siguin capaces per si soles de plegar el DNA, mentre que les histones H2A,H2B soles no ho puguin fer (Camerini-Otero *et al.*, 1976), ha suggerit la idea que durant la formació del nucleosoma primer s'uneixen les histones H3,H4 al DNA i després són les histones H2A,H2B les que completen l'estructura. Els resultats obtinguts en els experiments comentats en el paràgraf anterior confirmen el paper estructural diferent d'H3,H4 i

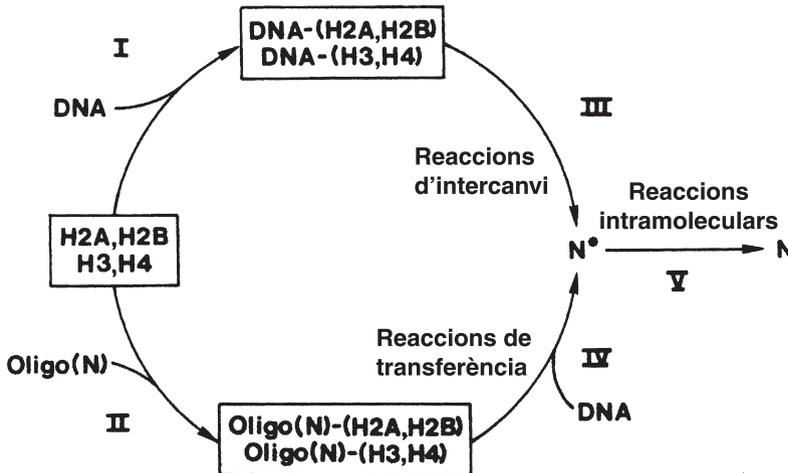


FIGURA 4. Reaccions espontànies que intervien en l'autoassociació *in vitro* de la partícula nucli del nucleosoma. N i N* representen, respectivament, la partícula nucli final i l'estructura intermediària produïda després de la unió inicial de les histones H2A, H2B, H3 i H4 amb el DNA; Oligo(N), oligonucleosomes sense H1/H5. Reproducció autoritzada d'Aragay *et al.* (1991), copyright 1991, American Chemical Society.

H2A,H2B (Samsó i Daban, 1993), però són incompatibles amb mecanismes que suggereixen una unió seqüencial ordenada de les parelles H3,H4 i H2A,H2B. Hi ha treballs sobre diversos sistemes de replicació, *in vitro* que afavoreixen el mecanisme d'unio de les parelles d'histones ordenada en dues etapes (Almouzni *et al.* 1990; Smith i Stillman, 1991), però els resultats recents de Gasser *et al.* (1996) indiquen que, *in vivo*, els nucleosomes es formen ràpidament i que no hi ha cap indicati que la unio al DNA de les histones H3,H4 i H2A,H2B s'esdevingui en dues etapes successives. D'altra banda, els resultats obtinguts per Jackson (1990) han demostrat que durant la replicació de la cromatina les parelles H2A,H2B i H3,H4 de nova síntesi es barregen aleatòriament amb les preexistents, de manera que els nous nucleosomes estan fets mitjançant un mecanisme en el qual aquestes parelles d'histones funcionen independentment i no com a blocs octamèrics (figura 5). En els òvuls de *Xenopus laevis* existeix una elevada concentració d'histones no associades amb el DNA, però també en aquest cas les parelles H2A,H2B estan separades de les histones H3,H4 (Earnshaw *et al.*, 1980; Kleinschmidt *et al.*, 1985). En aquest sistema, les histones H2A,H2B s'uneixen amb la proteïna nucleoplasmí, i les histones H3,H4 amb les proteïnes N1/N2. Aquestes proteïnes, i altres detectades en cèl·lules de mamífer, faciliten la formació de la partícula nucli (Dilworth *et al.*, 1987; Smith i Stillman, 1991). Encara que el mecanisme de formació dels nucleosomes *in vivo* sigui més complex que el mecanisme observat en els estudis fisicoquímics (figura 4), sembla raonable suposar que les reaccions espontànies trobades en aquests estudis intervenen en les etapes finals del procés de formació dels nucleosomes, és a dir, després que les proteïnes esmentades hagin alliberat les parelles d'histones. L'obtenció de nucleosomes complets,

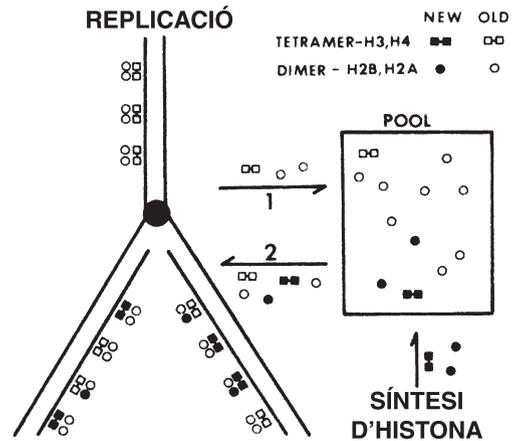


FIGURA 5. Model dinàmic sobre les interaccions histona-DNA durant la replicació de la cromatina. Les histones sintetitzades de nou es representen amb símbols negres, i les histones preexistents amb símbols buits. Reproducció autoritzada de Jackson (1990), Copyright 1990 American Chemical Society.

amb histona H1, i ben espaiats és un procés complex que requereix extractes cel·lulars (Rodríguez-Campos *et al.*, 1989).

Les partícules nucli tenen una flexibilitat conformacional notable que ha pogut detectar-se en estudis d'espectroscòpia de fluorescència (Daban i Cantor, 1989), de microscòpia electrònica (Czarnota i Ottensmeyer, 1996) i de modificació química de residus específics (Ballestar i Franco, 1997). A més, en presència de concentracions salines elevades, les partícules nucli poden dissociar-se totalment o parcialment (Aragay *et al.*, 1991). Aquestes propietats poden ésser importants per a la participació dels nucleosomes en la transcripció. Per exemple, s'ha descrit que un nucleosoma posicionat específicament en el promotor del virus MMTV resulta modificat estructuralment quan s'uneix amb diversos receptors hormonals (Piña *et al.*, 1990). Recentment s'han trobat activadors de la transcripció que tenen activitat d'acetil transferases d'histones (Yang *et al.*,

1996) i repressors amb activitat desacetilasa d'histones (Heinzel *et al.*, 1997). Pot suggerir-se que l'acetilació/desacetilació d'histones provoca canvis estructurals del nucleosoma (o en les interaccions entre nucleosomes) que tenen repercussió sobre l'expressió gènica. Ha estat descrit (Oliva *et al.*, 1990) que la hiperacetilació de les histones indueix el desplegament del nucleosoma. L'inici de la transcripció pot implicar la dissociació total o parcial de nucleosomes de les regions promotores. Puerta *et al.* (1993) han demostrat en experiments *in vitro* que mentre que els nucleosomes complets bloquegen l'inici de la transcripció, els nucleosomes sense H2A, H2B no afecten la iniciació i permeten una transcripció eficient. També en aquest sentit, Tsukiyama *et al.* (1994) han trobat que el factor transcripció GAGA provoca la dissociació de nucleosomes en el promotor hsp 70 de *Drosophila*. Com que aquest procés resulta facilitat per la presència d'ATP, s'ha suggerit que la dissociació de nucleosomes, necessària per a l'inici de la transcripció en aquest gen, requereix l'aportació d'energia química. A les regions on té lloc la transcripció hi ha un contingut relativament baix d'histones del tipus H1/H5 (Kamakaka i Thomas, 1990).

Hi ha estudis de microscòpia electrònica que demostren que els nucleosomes estan presents davant i darrere de la RNA polimerasa mentre té lloc l'elongació de la cadena de RNA (De Bernardin *et al.*, 1986). Hi ha hagut, però, molta controvèrsia sobre el mecanisme mitjançant el qual l'elongació de la transcripció podia tenir lloc sobre el DNA associat amb histones en els nucleosomes. Els dos primers treballs significatius sobre aquest tema varen arribar a conclusions completament contradictòries. Mentre Lorch *et al.* (1987) varen trobar que l'elongació de la cadena de RNA implica el desplaçament d'histones dels nucleosomes,

Losa i Brown (1987) varen publicar que l'elongació és possible sense dissociar els nucleosomes. En aquests treballs es varen emprar sistemes simplificats amb RNA polimerasa de bacteriòfag, i com a motlle de transcripció es feien servir fragments de DNA que tenen un promotor per a aquest enzim i que estan associats amb histones i formen nucleosomes. Fent servir un sistema d'aquest tipus, més recentment Studitsky *et al.* (1994) han trobat resultats consistents amb el model que es presenta a la figura 6. Aquests autors proposen que la polimerasa desplaça les histones del nucleosoma que es transcriu cap a l'extrem 5', però sense que es produeixi dissociació de les histones del DNA; és a dir que les histo-

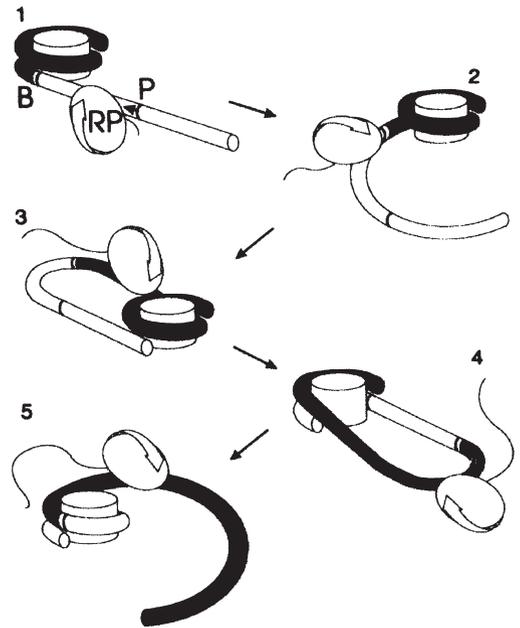


FIGURA 6. Mecanisme d'elongació de la transcripció sobre cromatina proposat per Studitsky *et al.* (1994). L'enzim RNA polimerasa (RP) realitza l'elongació de la cadena de RNA mentre que les histones que inicialment eren a la regió 3' passen a la 5' sense abandonar el DNA en cap moment. Reproducció autoritzada de Studitsky *et al.* (1994), copyright 1994 Cell Press..

nes canvien de posició sense deixar d'estar unides al DNA.

Els resultats de Studitsky *et al.* (1994) han estat obtinguts en un medi de concentració salina relativament baixa. Al nostre laboratori hem realitzat estudis de transcripció amb un sistema simplificat semblant al d'aquests autors però amb una concentració salina més semblant a la fisiològica (Gallego *et al.*, 1995), i els resultats obtinguts demostren que la transcripció dissocia completament els nucleosomes. El canvi d'energia lliure durant la síntesi de RNA és de -2 kcal/mol cada vegada que s'afegeix un nucleòtid (Erie *et al.*, 1992); si considerem els 146 nucleòtids que es poden obtenir en transcriure una partícula nucli, l'energia disponible és molt superior a la que estableix el nucleosoma (~ 10 kcal/mol, vegeu més amunt). A més, l'energia química de les reaccions d'elongació es pot convertir en energia mecànica útil perquè la regió 3' de la cadena naixent de RNA està aparellada amb el DNA motlle i això permet que la polimerasa, en allargar la cadena de RNA, exerceixi una força contra les histones del nucleosoma que pot provocar la seva dissociació. Resta per considerar on van a parar les histones alliberades. Els resultats obtinguts en aquests estudis (Gallego *et al.* 1995), junt amb dades prèvies sobre l'associació espontània d'histones en excés a nucleosomes (Aragay *et al.*, 1991; reaccions II i IV de la figura 4), suggereixen que les histones alliberades durant la transcripció poden unir-se transitòriament als nucleosomes de la cromatina no transcrita, tal com s'esquematitza a la figura 7. La concentració de cromatina al nucli cel·lular és elevada i pot facilitar que aquestes reaccions transitòries s'esdevinguin en les proximitats de qualsevol punt on una RNA polimerasa estigui transcrivint DNA nucleosomal. Com que és més estable el nucleosoma normal que els complexos amb histones en excés (Aragay *et al.*, 1991;

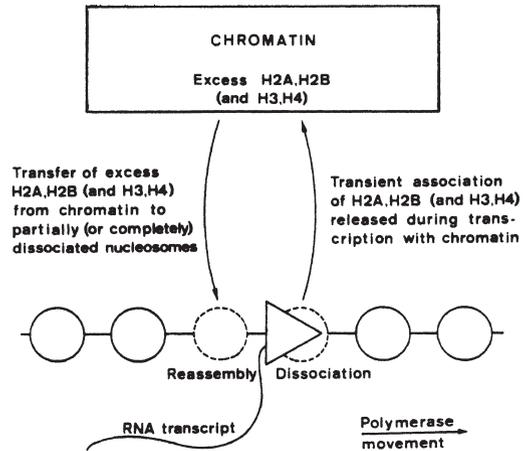


FIGURA 7. Mecanisme d'elongació de la transcripció sobre cromatina proposat en el laboratori de l'autor. Els resultats obtinguts (Gallego *et al.*, 1995) indiquen que amb una força iònica propera a la fisiològica els nucleosomes es dissocien durant l'elongació de la cadena de DNA. En aquest model, tenint en compte a més a més resultats previs del nostre laboratori (vegeu figura 4; Aragay *et al.*, 1991), es proposa que les histones dissociades s'uneixen transitòriament a la cromatina no transcrita. Reproducció autoritzada de Daban (1991), copyright 1991, CNRS Editions.

Gallego *et al.* 1995), la reassociació dels nucleosomes és, en principi, garantida per la termodinàmica a tots els llocs on hi hagi DNA lliure d'histones després del pas de la polimerasa.

ESTRUCTURES D'ORDRE SUPERIOR DE LA CROMATINA

El nucleosoma és el primer nivell d'empaquetament del DNA del nucli. El segon nivell consisteix en el plegament de les cadenes de nucleosomes, les quals formen unes estructures d'uns 30 nm de diàmetre que s'anomenen fibres de cromatina. Finch i Klug (1976) varen realitzar un estudi d'aquestes estructures mitjançant microscòpia electrònica i, a partir de l'observació d'es-

tries transversals inclinades i separades aproximadament 10 nm varen suggerir que a la fibra de cromatina les cadenes de nucleosomes estan plegades en forma de solenoide, és a dir, formant una hèlix senzilla d'un sol origen. Posteriorment, en un estudi de difracció de raigs X de fibres de cromatina parcialment orientades, Widom i Klug (1985) varen trobar una taca meridional corresponent a un espaiat de ~ 11 nm que suggereix que les cares laterals dels nucleosomes en el solenoide són aproximadament paral·leles a l'eix de la fibra (figura 8). Altres autors, a partir d'estudis de dispersió de neutrons (Suau *et al.*, 1979) i de dicroisme elèctric (Yabuki *et al.*, 1982; McGhee *et al.*, 1983), han donat suport al model solenoïdal i han indicat que les cares laterals dels nucleosomes estan inclinades entre 20° i 38° respecte a l'eix de la fibra.

Hi ha molta discussió sobre quina és realment l'estructura de les fibres plegades de cromatina (vegeu, per exemple, van Holde i Zlatanova, 1995). En el model del solenoide, en principi, per tal de construir l'hèlix senzilla de nucleosomes, cal que el DNA d'unió entre nucleosomes consecutius es plegui. En canvi, Williams *et al.* (1986) han trobat que el diàmetre de les fibres depèn de la longitud del DNA d'unió i han proposat que això és perquè els nucleosomes consecutius es posen en posicions oposades respecte a l'eix de la fibra i formen una doble hèlix, en la qual el DNA d'unió està estès a l'interior i influeix directament en el diàmetre de la fibra. Altres autors (figura 9), fent servir tècniques de reconstrucció d'imatges de microscòpia electrònica (Subirana *et al.*, 1985), de dispersió de raigs X de sincrotró (Bordas *et al.*, 1986; Koch, 1989), de microscòpia electrònica *in situ* a baixes temperatures (Woodcock *et al.*, 1993; Horowitz *et al.*, 1994) i de microscòpia de força atòmica (Leuba *et al.*, 1994), han estudiat les ziga-zagues formades per les cadenes de nucleoso-

mes a les fibres de cromatina (amb un nivell de compactació relativament baix), i també han suggerit models en els quals el DNA d'unió està creuat i va d'un costat a l'altre de la fibra. A més, els resultats de Subirana *et al.* (1985) indiquen que les fibres tenen una organització en capes de cinc a sis nucleosomes (figura 9A) que podrien explicar les discontinuïtats observades per altres autors (Zentgraf i Franke, 1984).

En condicions de força iònica relativament elevada les fibres de cromatina es condensen i formen estructures bastant irregulars (figura 10 de l'annex 6) Zlatanova *et al.*, 1994). L'estudi de la distribució dels nucleosomes en les fibres condensades és molt difícil perquè els nucleosomes individuals no poden visualitzar-se. Al nostre laboratori (Bartolomé *et al.*, 1994), hem preparat fragments de cromatina d'eritròcits de pollastre

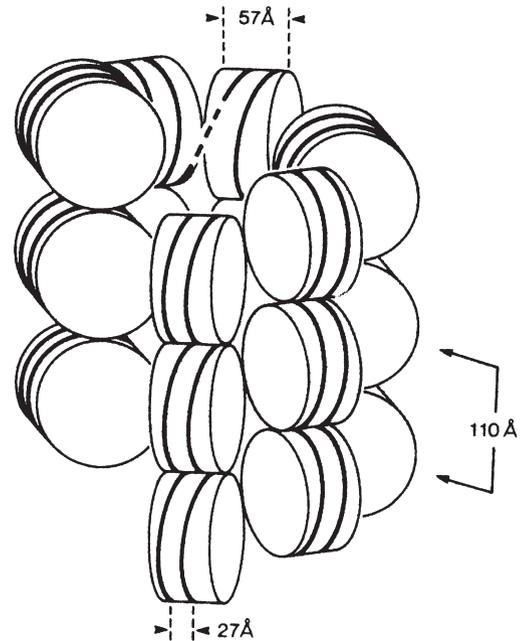


FIGURA 8. Model del solenoide per a les fibres de cromatina. Les dimensions principals estan indicades. Reproducció autoritzada de Widom i Klug (1985), copyright 1985, Cell Press.

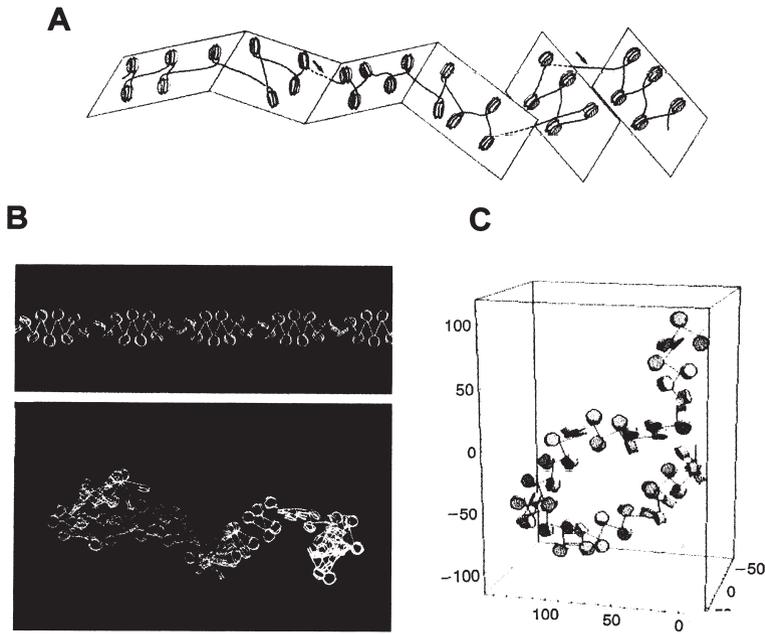


FIGURA 9. Diversos models de fibres de cromatina amb el DNA d'unió creuat. (A) La fibra està organitzada de tal manera que es formen capes de cinc a sis nucleosomes que donen una certa discontinuïtat a l'estructura (Subirana *et al.*, 1985). Fibres irregulars formades a partir de nucleosomes disposats en forma de ziga-zaga amb DNA d'unió de longitud variable proposades per Woodcock i col·laboradors (Woodcock *et al.*, 1993; Horowitz *et al.*, 1994) (B) i Leuba *et al.* (1994) (C). Com a referència, a la part superior de (B) hi ha una fibra regular que té el DNA d'unió de longitud fixa. Aquesta figura ha estat preparada a partir de reproduccions autoritzades de Subirana *et al.* (1985) (copyright 1985 Springer-Verlag), Horowitz *et al.* (1994) (copyright 1994 Rockefeller University Press) i Leuba *et al.* (1994) (copyright 1994, National Academy of Sciences, USA).

que contenen entre deu i trenta-sis nucleosomes, i hem observat en el microscopi electrònic que formen estructures circulars amb diàmetre constant i una alçada (mesurada a partir de preparacions amb platinació unidireccional) que augmenta amb el nombre de nucleosomes del fragment. Aquests resultats indiquen que es tracta d'estructures cilíndriques molt curtes (més compactes del que es podia esperar tenint en compte les dades prèvies d'altres laboratoris) que es col·loquen verticalment sobre la reixeta del microscopi. Aquestes preparacions ens han permès estudiar l'estructura interna de les fibres de cromatina vistes des de dalt (és a dir, ens han permès fer l'estudi d'una estruc-

tura equivalent a la secció transversal de la fibra). A les imatges obtingudes s'observen els elements estructurals següents: (1) una perifèria helicoïdal, (2) una anella de ~11 nm de gruix que presenta barres radials probablement originades per les partícules nucli, i (3) un forat central de 8-12 nm. En estudis de desnaturalització parcial (Bermúdez *et al.*, 1998) hem aconseguit generar llaçades de DNA, amb longituds corresponents a un, dos o tres nucleosomes consecutius desnaturalitzats, que surten radialment de les fibres vistes des de dalt, la qual cosa demostra una distribució radial de nucleosomes. A més, d'acord amb l'observació del fet que els punts d'entrada i sortida del DNA de les

llaçades corresponents a dos nucleosomes consecutius desnaturalitzats estan relativament propers, en principi, hem d'excloure la possibilitat que els nucleosomes consecutius estiguin en posicions oposades respecte a l'eix de la fibra.

En conjunt, tots aquests elements estructurals ens han conduït a proposar un model solenoïdal per a l'estructura de la fibra de cromatina (figura 11 de l'annex 6) que és molt més compacte que els suggerits anteriorment, perquè està basat en la interdigitació dels nucleosomes dels successius pisos d'una hèlix senzilla (Daban i Bermúdez, 1998). Aquesta interdigitació de l'hèlix primària provoca l'establiment de contactes laterals entre nucleosomes de diferents nivells i fa que es formin hèlixs secundàries (figura 11B, C de l'annex 6) que donen sentit a observacions de fa anys que indicaven una gran tendència espontània a la formació d'estructures helicoidals a partir de partícules nucli isolades (Dubochet i Noll, 1978) o fins i tot a partir dels octàmers d'histones purificats (Klug *et al.*, 1980). Aquesta estructura és tan compacta que redueix aproximadament noranta vegades la longitud del DNA; el model estàndard del solenoide i altres models comentats en aquest apartat produeixen una reducció de longitud de tan sols unes quaranta vegades (compareu les figures 11C i 11E de l'annex 6).

Hem desenvolupat un mètode electroforètic que permet analitzar l'estructura dels fragments de cromatina en gels d'agrosa en presència de Mg^{2+} (Bartolomé *et al.*, 1995). Les bandes característiques dels fragments plegats en forma de fibra compacta tan sols poden obtenir-se en presència de les histones H1/H5. Mitjançant experiments de dispersió de neutrons, Graziano *et al.* (1994) han demostrat que la histona H1 està localitzada a l'interior de la fibra de cromatina plegada, aproximadament a 6 nm del centre. Tot i que les fibres de cromatina són força

complexes, el procés de plegament és espontani, i els nostres resultats electroforètics (Bartolomé *et al.*, 1995) i de microscòpia electrònica (Bartolomé *et al.*, 1994) indiquen que per iniciar una fibra de cromatina plegada es requereixen tan sols de cinc a set nucleosomes. Per això, en la família de models interdigitats que hem proposat (Daban i Bermúdez, 1998), les hèlixs primàries estan formades amb molt pocs nucleosomes (de 2,8 a 5,8) per volta. Pérez-Grau *et al.* (1982) varen observar que els dinucleosomes amb histones H1/H5 i en presència de Mg^{2+} formen estructures semblants a les fibres de cromatina plegades. Al nostre laboratori hem observat que els fragments de tres o quatre nucleosomes són capaços d'autoassociar-se per formar complexos que tenen l'estructura circular (Bartolomé *et al.*, 1994) i les propietats electroforètiques (Bartolomé *et al.*, 1995) característiques de les fibres plegades. Aquests resultats demostren que els nucleosomes tenen incorporades les propietats adients per formar estructures plegades tan estables que no requereixen ni tan sols la continuïtat del DNA.

La controvèrsia existent sobre l'estructura de la fibra de cromatina podria tenir una solució per la via de la síntesi. Aquesta síntesi requereix considerar que els models proposats corresponen a diversos nivells d'empaquetament. Els models amb el DNA d'unió creuat explicarien les formes menys condensades de la fibra de cromatina. El model estàndard del solenoide correspondria a un nivell intermedi d'empaquetament, en el qual és necessari que el DNA d'unió es plegui almenys fins a un cert grau. El solenoide interdigitat seria la forma més compacta i estable per raó de les interaccions laterals entre nucleosomes a les hèlixs secundàries. En tots els nivells d'empaquetament, a més, caldria tenir en compte la possibilitat d'existència de discontinuïtats.

CONSIDERACIONS FINALS

Mentre que 10 nm de DNA estès tenen un contingut d'informació de ~120 bits, les fibres de cromatina representades mitjançant el model proposat pel nostre laboratori tenen més de 10.000 bits per cada 10 nm. Aquestes estructures representen tan sols el segon nivell de plegament del DNA al nucli cel·lular, calen altres nivells addicionals per arribar a formar cromosomes metafàsics. A més, cal tenir en compte que les fibres de cromatina estan organitzades dins l'entramat de la matriu nuclear (Berezney i Jeon, 1995).

Hem vist en aquest capítol que la cèl·lula ha resolt els problemes bàsics de la construcció d'una memòria tridimensional fent servir proteïnes que interaccionen de manera inespecífica amb el DNA i que produeixen estructures repetides que són estables, però que alhora poden participar en una dinàmica funcional molt complexa. D'entrada, resulta sorprenent que per a la formació d'aquestes *estructures generals* la cèl·lula hagi hagut de fer servir unes proteïnes tan conservades a l'evolució com són les histones (Isenberg, 1979; Arents *et al.*, 1995). Probablement, el problema de la construcció d'un sistema tridimensional funcional, que permeti l'empaquetament, la replicació i la transcripció (i fins i tot, potser també caldria considerar aquí l'autodestrucció programada [apoptosi] del DNA, és tan complex que tan sols unes proteïnes que han conservat quasi la totalitat de la seva seqüència han pogut mantenir una solució viable.

AGRAÏMENTS

Agraïco als professors Jaume Palau i Joan Antoni Subirana que m'haguessin introduït en el món de la biologia molecular, en una època en què érem ben pocs a Barcelona els que teníem accés experimental al DNA. Agraïco

al professor Charles Cantor i als meus deixebles, Drs. Pilar Díaz, Anna Aragay, Xavier Fernández-Busquets, Montserrat Samsó, Salvador Bartolomé, Paqui Gallego i Toni Bermúdez, la seva col·laboració en diverses contribucions esmentades en aquest capítol. Les figures per a aquest treball han estat preparades al Laboratori d'Anàlisi i Fotodocumentació del Departament de Bioquímica i de Biologia Molecular, Universitat Autònoma de Barcelona. Treball subvencionat en part per la DGICYT (projecte PB95-0611).

BIBLIOGRAFIA

- ALLAN, J.; HARTMAN, P. G.; CRANE-ROBINSON, C.; AVILES, F. X. (1980). «The structure of histone H1 and its location in chromatin». *Nature*, núm. 288, pàg. 675-679.
- ALMOUZNI, G.; CLARK, D. J.; MÉCHALI, M.; WOLFFE, A. P. (1990). «Chromatin assembly on replicating DNA *in vitro*». *Nucleic Acids Res.*, núm. 18, pàg. 5767-5774.
- ARAGAY, A. M.; DÍAZ, P.; DABAN, J.-R. (1988). «Association of nucleosome core particle DNA with different histone oligomers. Transfer of histones between DNA-(H2A,H2B) and DNA-(H3,H4) complexes». *J. Mol. Biol.*, núm. 204, pàg. 141-154.
- ARAGAY, A. M.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.; DABAN, J.-R. (1991). «Different mechanisms for the *in vitro* formation of nucleosome core particles». *Biochemistry*, núm. 30, pàg. 5022-5032.
- ARENDS, G.; BURLINGAME, R. W.; WANG, B.-C.; LOVE, W. E.; MOUDRIANAKIS, E. N. (1991). «The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å: A tripartite protein assembly and a left-handed superhelix». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 88, pàg. 10148-10152.
- ARENDS, G.; MOUDRIANAKIS, E. N. (1995). «The histone fold: A ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 92, pàg. 11170-11174.
- AUSIÓ, J.; DONG, F.; VAN HOLDE, K. E. (1989). «Use of selectively trypsinized nucleosome core particles to analyze the role of the histone «tails» in the stabilization of the nucleosome». *J. Mol. Biol.*, núm. 206, pàg. 451-463.
- BALLESTAR, E.; FRANCO, L. (1997). «Use of the transglutaminase reaction to study the dissociation of histone N-terminal tails from DNA in nucleosome core particles». *Biochemistry*, núm. 36, pàg. 5963-5969.
- BARTOLOMÉ, S.; BERMÚDEZ, A.; DABAN, J.-R. (1994). «Internal structure of the 30 nm chromatin fiber». *J. Cell Sci.*, núm. 107, pàg. 2983-2992.

- BARTOLOMÉ, S.; BERMÚDEZ, A.; DABAN, J.-R. (1995). «Electrophoresis of chromatin on nondenaturing agarose gels containing Mg^{2+} . Self-assembly of small chromatin fragments and folding of the 30-nm fiber». *J. Biol. Chem.*, núm. 270, pàg. 22514-22521.
- BEREZNEY, R.; JEON, K. W. (1995). «Nuclear matrix. Structural and functional organization». Londres: Academic Press.
- BERMÚDEZ, A.; BARTOLOMÉ, S.; DABAN, J.-R. (1998). «Partial denaturation of small chromatin fragments: Direct evidence for the radial distribution of nucleosomes in folded chromatin fibers». *J. Cell. Sci.*, núm. 111, pàg. 1707-1715.
- BÖHM, L.; CRANE-ROBINSON, C. (1984). «Proteases as structural probes for chromatin: The domain structure of histones». *Bioscience Reports*, núm. 4, pàg. 365-386.
- BORDAS, J.; PEREZ-GRAU, L.; KOCH, M. H. J.; VEGA, M. C.; NAVE, C. (1986). «The superstructure of chromatin and its condensation mechanism. II. Theoretical analysis of the X-ray scattering patterns and model calculations». *Eur. Biophys. J.*, núm. 13, pàg. 175-185.
- BRADBURY, E. M.; BALDWIN, J. P. (1986). «Neutron scatter and diffraction techniques applied to nucleosome and chromatin structure». *Cell Biophys.*, núm. 9, pàg. 35-66.
- CAMERINI-OTERO, R. D.; SOLLNER-WEBB, B.; FELSENFELD, G. (1976). «The organization of histones and DNA in chromatin: Evidence for an arginine-rich histone kernel». *Cell*, núm. 8, pàg. 333-347.
- CORNUDELLA, L.; ROCHA, E. (1979). «Nucleosome organization during germ cell development in the sea cucumber *Holothuria tubulosa*». *Biochemistry*, núm. 18, pàg. 3724-3732.
- CZARNOTA, G. J.; OTTENSMEYER, F. P. (1996). «Structural states of the nucleosome». *J. Biol. Chem.*, núm. 271, pàg. 3677-3683.
- DABAN, J.-R. (1991). «Formation of nucleosomes by histone transfer reactions at physiological ionic strength». A: Marion, C. *Chromatine: Aspects structuraux et fonctionnels*. París: CNRS Editions. pàg. 65-71.
- DABAN, J.-R.; BERMÚDEZ, A. (1998). «Interdigitated solenoid model for compact chromatin fibers». *Biochemistry*, núm. 37, pàg. 4299-4304.
- DABAN, J.-R.; CANTOR, C. R. (1982a). «Structural and kinetic study of the self-assembly of nucleosome core particles». *J. Mol. Biol.*, núm. 156, pàg. 749-769.
- DABAN, J.-R.; CANTOR, C. R. (1982b). «Role of histone pairs H2A, H2B and H3, H4 in the self-assembly of nucleosome core particles». *J. Mol. Biol.*, núm. 156, pàg. 771-789.
- DABAN, J.-R.; CANTOR, C. R. (1989). «Use of fluorescent probes to study nucleosomes». *Methods in Enzymology*, núm. 170, pàg. 192-214.
- DE BERNARDIN, W.; KOLLER, T.; SOGO, J. M. (1986). «Structure of *in-vitro* transcribing chromatin as studied in simian virus 40 minichromosomes». *J. Mol. Biol.*, núm. 191, pàg. 469-482.
- DÍAZ, P.; DABAN, J.-R. (1986). «Nucleosome core particle self-assembly kinetics and stability at physiological ionic strength». *Biochemistry*, núm. 25, pàg. 7736-7744.
- DILWORTH, S. M.; BLACK, S. J.; LASKEY, R. A. (1987). «Two complexes that contain histones are required for nucleosome assembly *in vitro*: Role of nucleoplasmin and N1 in *Xenopus* egg extracts». *Cell*, núm. 51, pàg. 1009-1018.
- DUBOCHET, J.; NOLL, M. (1978). «Nucleosome arcs and helices». *Science*, núm. 202, pàg. 280-286.
- EARNSHAW, W. C.; HONDA, B. M.; LASKEY, R. A.; THOMAS, J. O. (1980). «Assembly of nucleosomes: The reaction involving *X. laevis* nucleoplasmin». *Cell*, núm. 21, pàg. 373-383.
- ERIE, D. A.; YAGER, T. D.; VON HIPPEL, P. H. (1992). «The single-nucleotide addition cycle in transcription: A biophysical and biochemical perspective». *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, núm. 21, pàg. 379-415.
- FINCH, J. T.; KLUG, A. (1976). «Solenoidal model for superstructure in chromatin». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 73, pàg. 1897-1901.
- GALLEGO, F.; FERNÁNDEZ-BUSQUETS, X.; DABAN, J.-R. (1995). «Mechanism of nucleosome dissociation produced by transcription elongation in a short chromatin template». *Biochemistry*, núm. 34, pàg. 6711-6719.
- GASSER, R.; KOLLER, T.; SOGO, J. M. (1996). «The stability of nucleosomes at the replication fork». *J. Mol. Biol.*, núm. 258, pàg. 224-239.
- GRAZIANO, V.; GERCHMAN, S. E.; RAMAKRISHNAN, V. (1988). «Reconstitution of chromatin higher order structure from histone H5 and depleted chromatin». *J. Mol. Biol.*, núm. 203, pàg. 997-1007.
- GRAZIANO, V.; GERCHMAN, S. E.; SCHNEIDER, D. K.; RAMAKRISHNAN, V. (1994). «Histone H1 is located in the interior of the chromatin 30-nm filament». *Nature*, núm. 368, pàg. 351-354.
- HEINZEL, T.; LAVINSKY, R. M.; MULLEN, T.-M.; SÖDERSTRÖM, M.; LAHERTY, C. D.; TORCHIA, J.; YANG, W.-M.; BRARD, G.; NGO, S. D.; DAVIE, J. R.; SETO, E.; EISENMAN, R. N.; ROSE, D. W.; GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. (1997). «A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression». *Nature*, núm. 387, pàg. 43-48.
- HEWISH, D. R.; BURGOYNE, L. A. (1973). «Chromatin substructure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by nuclear deoxyribonuclease». *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, núm. 52, pàg. 504-510.
- VAN HOLDE, K.; ZLATANOVA, J. (1995). «Chromatin higher order structure: Chasing a mirage?» *J. Biol. Chem.*, núm. 270, pàg. 8373-8376.

- HOROWITZ, R. A.; AGARD, D. A.; SEDAT, J. W.; WOODCOCK, C. L. (1994). «The three-dimensional architecture of chromatin *in situ*: Electron tomography reveals fibers composed of a continuously variable zig-zag nucleosomal ribbon». *J. Cell Biol.*, núm. 125, pàg. 1-10.
- ISENBERG, I. (1979). «Histones». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 48, pàg. 159-191.
- JACKSON, V. (1990). «*In vivo* studies on the dynamics of histone-DNA interaction: Evidence for nucleosome dissolution during replication and transcription and low level of dissolution independent of both». *Biochemistry*, núm. 29, pàg. 719-731.
- KAMAKAKA, R. T.; THOMAS, J. O. (1990). «Chromatin structure of transcriptionally competent and repressed genes». *EMBO J.*, núm. 9, pàg. 3997-4006.
- KLEINSCHMIDT, J. A.; FORTKAMP, E.; KROHNE, G.; ZENTGRAF, H.; FRANKE, W. W. (1985). «Co-existence of two different types of soluble histone complexes in nuclei of *Xenopus laevis* oocytes». *J. Biol. Chem.*, núm. 260, pàg. 1166-1176.
- KLUG, A.; RHODES, D.; SMITH, J.; FINCH, J. T.; THOMAS, J. O. (1980). «A low resolution structure for the histone core of the nucleosome». *Nature*, núm. 287, pàg. 509-516.
- KOCH, M. H. J. (1989). «Structure and condensation of chromatin». A: Saenger, W.; Heinemann, U. *Protein-Nucleic Acid Interaction*. Londres: McMillan Press. pàg. 163-204.
- KORNBERG, R. D. (1977). «Structure of chromatin». *Annu. Rev. Biochem.*, núm. 46, pàg. 931-954.
- LEUBA, S. H.; YANG, G.; ROBERT, C.; SAMORI, B.; VAN HOLDE, K.; ZLATANOVA, J.; BUSTAMANTE, C. (1994). «Three-dimensional structure of extended chromatin fibers as revealed by tapping-mode scanning force microscopy». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 11621-11625.
- LORCH, Y.; LAPOINTE, J. W.; KORNBERG, R. D. (1987). «Nucleosomes inhibit the initiation of transcription but allow chain elongation with the displacement of histones». *Cell*, núm. 49, pàg. 203-210.
- LOSA, R.; BROWN, D. D. (1987). «A bacteriophage RNA polymerase transcribes *in vitro* through a nucleosome core without displacing it». *Cell*, núm. 50, pàg. 801-808.
- LOWARY, P. T.; WIDOM, J. (1997). «Nucleosome packaging and nucleosome positioning of genomic DNA». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 94, pàg. 1183-1188.
- LUGER, K.; MÄDER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. (1997). «Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution». *Nature*, núm. 389, pàg. 251-260.
- MCGHEE, J. D.; NICKOL, J. M.; FELSENFELD, G.; RAU, D. C. (1983). «Higher order structure of chromatin: Orientation of nucleosomes within the 30 nm chromatin solenoid is independent of species and spacer length». *Cell*, núm. 33, pàg. 831-841.
- NELSON, H. C. M.; FINCH, J. T.; LUISI, B. F.; KLUG, A. (1987). «The structure of an oligo(dA)-oligo(dT) tract and its biological implications». *Nature*, núm. 330, pàg. 221-226.
- OLIVA, R.; BAZETT-JONES, D. P.; LOCKLEAR, L.; DIXON, G. H. (1990). «Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle». *Nucleic Acids Res.*, núm. 18, pàg. 2739-2747.
- PÉREZ-GRAU, L.; AZORÍN, F.; SUBIRANA, J. A. (1982). «Aggregation of mono- and dinucleosomes into chromatin-like fibers». *Chromosoma*, núm. 87, pàg. 437-445.
- PIÑA, B.; BRÜGGEMEIER, U.; BEATO, M. (1990). «Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter». *Cell*, núm. 60, pàg. 719-731.
- PRUSS, D.; BARTHOLOMEW, B.; PERSINGER, J.; HAYES, J.; ARENTS, G.; MOUDRIANAKIS, E. N.; WOLFFE, A. P. (1996). «An asymmetric model for the nucleosome: A binding site for linker histones inside the DNA gyres». *Science*, núm. 274, pàg. 614-617.
- PUERTA, C.; HERNÁNDEZ, F.; GUTIÉRREZ, C.; PIÑEIRO, M.; LÓPEZ-ALARCÓN, L.; PALACIÁN, E. (1993). «Efficient transcription of a DNA template associated with histone (H3-H4)₂ tetramers». *J. Biol. Chem.*, núm. 268, pàg. 26663-26667.
- PUIGDOMÈNECH, P.; PALAU, J.; CRANE-ROBINSON, C. (1980). «The structure of sea-urchin-sperm histone $\phi 1$ (H1) in chromatin and free solution. Trypsin digestion and spectroscopic studies». *Eur. J. Biochem.*, núm. 104, pàg. 263-270.
- RAMAKRISHNAN, V.; FINCH, J. T.; GRAZIANO, V.; LEE, P. L.; SWEET, R. M. (1993). «Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding». *Nature*, núm. 362, pàg. 219-223.
- RODRÍGUEZ-CAMPOS, A.; SHIMAMURA, A.; WORCEL, A. (1989). «Assembly and properties of chromatin containing histone H1». *J. Mol. Biol.*, núm. 209, pàg. 135-150.
- RUIZ-CARRILLO, A.; JORCANO, J. L.; EDER, G.; LURZ, R. (1979). «In vitro core particle and nucleosome assembly at physiological ionic strength». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 76, pàg. 3284-3288.
- SAMSÓ, M.; DABAN, J.-R. (1993). «Unfolded structure and reactivity of nucleosome core particle DNA-histone H2A, H2B complexes as studied by synchrotron radiation X-ray scattering». *Biochemistry*, núm. 32, pàg. 4609-4614.
- SATCHWELL, S. C.; DREW, H. R.; TRAVERS, A. A. (1986). «Sequence periodicities in chicken nucleosome core DNA». *J. Mol. Biol.*, núm. 191, pàg. 659-675.
- SHRADER, T. E.; CROTHERS, D. M. (1989). «Artificial nucleosome positioning sequences». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 86, pàg. 7418-7422.
- SMITH, S.; STILLMAN, B. (1991). «Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*». *EMBO J.*, núm. 10, pàg. 971-980.

- STUDITSKY, V. M.; CLARK, D. J.; FELSENFELD, G. (1994). «A histone octamer can step around a transcribing polymerase without leaving the template». *Cell*, núm. 76, pàg. 371-382.
- SUAU, P.; BRADBURY, E. M.; BALDWIN, J. P. (1979). «Higher-order structures of chromatin in solution». *Eur. J. Biochem.*, núm. 97, pàg. 593-602.
- SUBIRANA, J. A.; MUÑOZ-GUERRA, S.; AYMAMÍ, J.; RADERMACHER, M.; FRANK, J. (1985). «The layered organization of nucleosomes in 30 nm chromatin fibers». *Chromosoma*, núm. 91, pàg. 377-390.
- TSUKIYAMA, T.; BECKER, P. B.; WU, C. (1994). «ATP-dependent nucleosome disruption at heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor». *Nature*, núm. 367, pàg. 525-532.
- WIDLUND, H. R.; CAO, H.; SIMONSSON, S.; MAGNUSSON, E.; SIMONSSON, T.; NIELSEN, P. E.; KAHN, J. D.; CROTHERS, D. M.; KUBISTA, M. (1997). «Identification and characterization of genomic nucleosome-positioning sequences». *J. Mol. Biol.*, núm. 267, pàg. 807-817.
- WIDOM, J.; KLUG, A. (1985). «Structure of the 300 Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples». *Cell*, núm. 43, pàg. 207-213.
- WILLIAMS, S. P.; ATHEY, B. D.; MUGLIA, L. J.; SCHAPPE, R. S.; GOUGH, A. H.; LANGMORE, J. P. (1986). «Chromatin fibers are left-handed double helices with diameter and mass per unit length that depend on linker length». *Biophys. J.*, núm. 49, pàg. 233-248.
- WILLIAMS, S. P.; LANGMORE, J. P. (1991). «Small angle X-ray scattering of chromatin: Radius and mass per unit length depend on linker length». *Biophys. J.*, núm. 59, pàg. 606-618.
- WOLFFE, A. (1995). «Chromatin structure and function». Londres: Academic Press.
- WOODCOCK, C. L.; GRIGORYEV, S. A.; HOROWITZ, R. A.; WHITAKER, N. (1993). «A chromatin folding model that incorporates linker variability generates fibers resembling the native structures». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 90, pàg. 9021-9025.
- YABUKI, H.; DATTA GUPTA, N.; CROTHERS, D. M. (1982). «Orientation of nucleosomes in the thirty-nanometer chromatin fiber». *Biochemistry*, núm. 21, pàg. 5015-5020.
- YANG, X.-J.; OGRYZCO, V. V.; NISHIKAWA, J.; HOWARD, B. H.; NAKATANI, Y. (1996). «A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A». *Nature*, núm. 282, pàg. 319-324.
- ZENTGRAF, H.; FRANKE, W. W. (1984). «Differences of supranucleosomal organization in different kinds of chromatin: Cell type-specific globular subunits containing different numbers of nucleosomes». *J. Cell Biol.*, núm. 99, pàg. 272-286.
- ZLATANOVA, J.; LEUBA, S. H.; YANG, G.; BUSTAMANTE, C.; VAN HOLDE, K. (1994). «Linker DNA accessibility in chromatin fibers of different conformations: A reevaluation». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, núm. 91, pàg. 5277-5280.

ANNEX 6

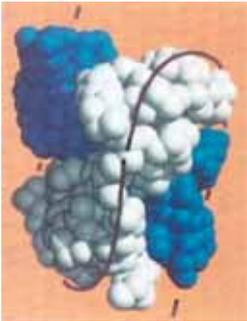


Figura 1. Estructura de l'octàmer d'histones de la partícula nucli. Es forma una rampa helicoidal levogira (indicada amb una línia negra) que comença en el dímer H2AH2B (blau) de l'esquerra, segueix en el tetràmer H₃H₄₂ (la primera meitat és el dímer H3H4 de la part de baix a l'esquerra i la segona meitat és el dímer H3H4 de la part de dalt a la dreta), i acaba en el dímer H2AH2B (blau) de la dreta. L'estructura està orientada de manera que l'eix de simetria binari passa pel centre de la figura i és perpendicular al pla del paper. Reproducció autoritzada d'Arents *et al.* (1991).

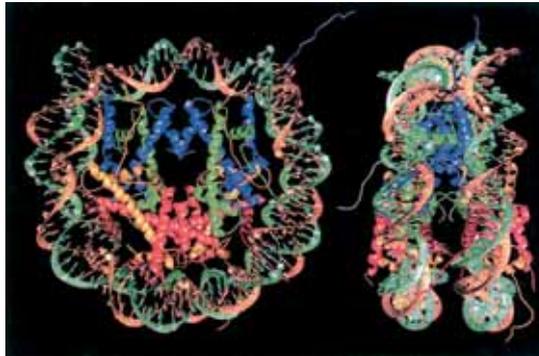


Figura 3. Estructura de la partícula nucli del nucleosoma. Les dues cadenes de DNA (color marró i verd fosc) formen una superhèlix de 146 pb sobre l'octàmer d'histones (H2A, groc; H2B, vermell; H3, violat; H4, verd clar). Globalment l'estructura correspon a un cilindre de ~11 nm de diàmetre i ~6 nm d'altura. A més del motiu estructural *plegament d'histona* (figura 2), i altres zones estructurals de les histones, poden observar-se seqüències que adopten una conformació molt estesa i que corresponen a la part de les cues N-terminals que ha pogut ser detectada en el mapa de densitat electrònica (en total s'han posicionat el 80% dels residus d'histona). A les dues figures l'eix de simetria binari passa pel centre de l'estructura i és paral·lel als marges laterals del requadre negre. Reproducció autoritzada de Nature (Luger *et al.*, 1997), Copyright 1997 Macmillan Magazines Limited.

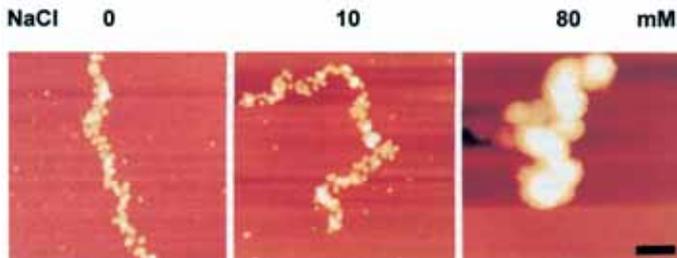


Figura 10. Imatges de microscòpia de força atòmica de rastreig corresponents a fibres de cromatina d'eritrocit de pollastre en presència de trietanolamina-HCl 5mM (pH 7.0) i de les concentracions de NaCl indicades (Zlatanova *et al.*, 1994). El model de la figura 9C ha estat proposat a partir dels resultats obtinguts mitjançant aquesta tècnica amb fibres com les que es mostren a l'extrem esquerre d'aquesta figura (Leuba *et al.*, 1994). Reproducció autoritzada de Zlatanova *et al.* (1994), Copyright 1994 National Academy of Sciences, USA.

ANNEX 6

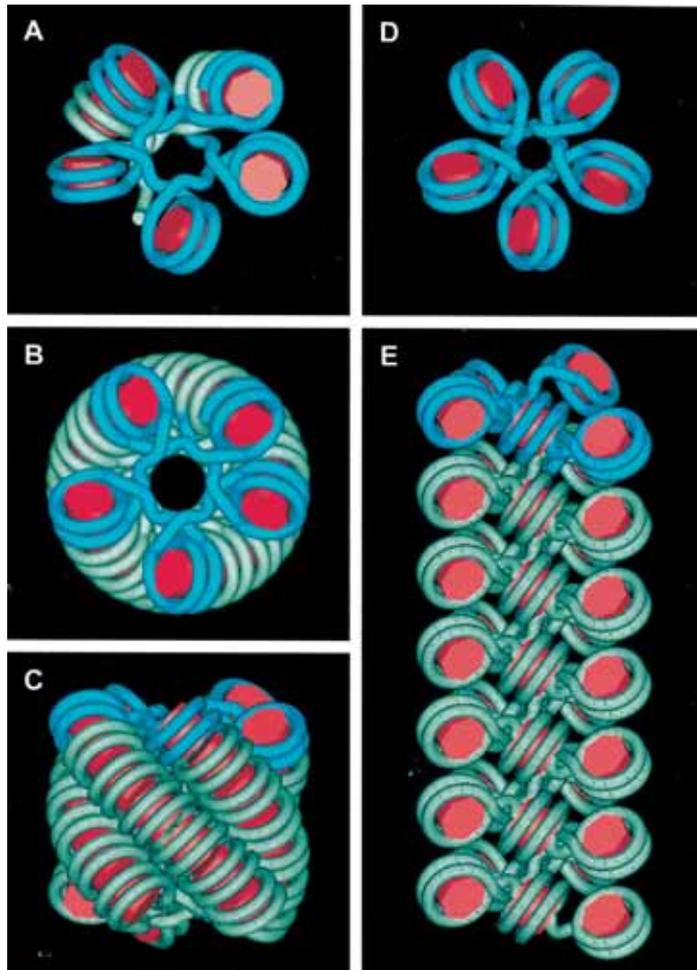


Figura 11. Comparació del grau d'empaquetament del model helicoïdal interdigitat (C, Daban i Bermúdez, 1998) amb el solenoide normal (E) (ambdues figures tenen trenta-cinc nucleosomes representats a la mateixa escala). (B) i (D) són vistes des de dalt de (C) i (E), respectivament. (A) representa la primera volta completa (DNA) en color blau i part de la segona volta de l'hèlix primària (4,75 nucleosomes per volta; pas de 3,84 nm). Els nucleosomes estan inclinats 40° respecte a l'eix de la fibra i formen cinc hèlixs secundàries de partícules nucli associades lateralment que es poden veure a les figures (B) i (C). El nombre d'hèlixs secundàries varia segons els paràmetres de l'hèlix primària (Daban i Bermúdez, 1998). La disposició del DNA d'unió no és coneguda, però en el model s'han inclòs 60 pb (longitud corresponent al DNA d'unió d'eritròcits de pollastre) amb una conformació arbitrària per demostrar que hi ha espai per a un forat central considerable (diàmetre 7,3 nm). El diàmetre exterior de solenoide interdigitat que es presenta és de 36 nm. El radi de gir respecte a l'eix de la fibra calculat per a aquesta estructura és de 12 nm. Aquest valor és coincident amb el radi de gir obtingut experimentalment per fibres de cromatina (d'eritròcit de pollastre en presència d'una força iònica relativament elevada) analitzades en diversos laboratoris mitjançant dispersió de raigs X (Williams i Langmore, 1991) i neutrons (Bradbury i Baldwin, 1986; Graziano *et al.*, 1988 i 1994). El solenoide que es presenta en (E) (pas de 11nm, 33nm de diàmetre, nucleosomes inclinats 30°) té 5,0 nucleosomes per volta; és a dir, té aproximadament el mateix nombre de nucleosomes per volta que el solenoide interdigitat que es presenta en (C), però és 2,7 vegades menys compacte que l'estructura interdigitada. Reproducció autoritzada de Daban i Bermúdez (1998), Copyright 1998 American Chemical Society.